动 物 学 研 究 2004, Jun. 25 (3): 185－190 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

185

用线粒体 tRNA 基因探讨现存两栖动物三个目间系统发生关系

刘忠权[2]，王义权[1,*]，周开亚[2]
（1. 厦门大学 生命科学学院，福建 厦门 361005；2. 南京师范大学 遗传资源研究所，江苏 南京 210097）

摘要：现存两栖类3个目的系统发生关系仍然没有统一意见，最广泛被接受的假说是单系起源，并且无尾类和有尾类为姐妹群关系而排斥蚓螈类（蛙类假说）。然而，这一假说一直存在争议。我们在测定了泽蛙线粒体基因组全序列的基础上，与已知其他的6种两栖类进行详细的比较分析，同时选择了11种高等脊椎动物的线粒体全基因序列，以硬骨鱼类作外群，用22个tRNA基因合并数据进行系统发生重建分析，结果表明MP、ML树都强力地支持现生两栖类动物为单系群，并且有尾目和蚓螈目为姐妹群关系。这个结果与蛙类假说是相矛盾的，与Bolt（1991）在形态学基础上提出的有尾类和蚓螈类为姐妹群关系的假说相一致，并得到建立在线粒体和核rRNA基因数据基础上的许多分子研究的支持。另外还探讨了本结果与前人的研究不一致的原因，以及利用线粒体全基因序列进行系统发生分析可能存在的偏差。

关键词：两栖类；tRNA 基因；系统发生
中图分类号：Q959.5 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2004)03－0185－06

Phylogentic Relationships of Living Amphibians Among Three Orders Based on the Mitochondrial tRNA Genes

LIU Zhong-quan[2], WANG Yi-quan[1,*], ZHOU Kai-ya[2]
(1. *School of Life Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian* 361005, *China*;
2. *Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu* 210097, *China*)

Abstract: To date, there still is lack of a general consensus regarding the phylogenetic relationships of three living orders of amphibian among herpetologists. The most widely accepted hypothesis is the monophyletic origin in the class Amphibia, which proposed a sister-group relationship between Caudata and Anura (the Batrachia hypothesis) to the exclusion of the Gymnophiona. However, the phylogenetic relationship among living amphibians is still a controversial issue. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *Fejervarya limnocharis* was detailedly compared with those of 6 other amphibians. The nucleotide sequences of 22 tRNA encoded by 7 amphibians mitochondrial genomes were combined and aligned to the homologous sequences of the 11 veterbrate taxa. Teleosts selected as outgroup, the phylogenetic analyses results show that MP and ML trees all strongly support the monophyly of living amphibians with respect to other living tetrapods and favor a sister group relationship for caecilians and urodeles. Robustness of our results was confirmed by high bootstrap support of all nodes in the trees. This result contradicts the Batrachia hypothesis, and is consistent with Bolt's hypothesis (1991) basing on the morphological data. The result was also supported by previous molecular studies based on the data from mitochondrial and nuclear rRNA genes. In addition, the reason for our result inconsistent with previous works and the shortcomings of phylogenetic analyses based on the complete mitochondrial genomes were also discussed.

Key words: Amphibian; tRNA gene; Phylogenetic relationship

收稿日期：2003－12－09；接受日期：2004－03－23
基金项目：教育部骨干教师资助计划项目（GG－180－21002403－1740）；教育部留学回国人员启动基金资助
Foundation item: The project supported by foundation for Univ. Key Teacher from State Education Ministry and SRF for ROCS, SEM
* 通讯作者（Corresponding author），E-mail：wangyqnj@jlonline.com
第一作者简介：刘忠权，男，40岁，博士，副教授。研究方向 动物分子生物学。现工作单位 盐城师范学院生物系（邮政编码224002）。

现存两栖类动物分为3个目，它们的体形迥然不同，这与它们的生活习性及活动方式有一定关系。无尾目（Anura）有发达的后肢和简化的骨骼，适应跳跃；有尾目（Caudata）身体较长，四肢较短，骨骼相对原始；蚓螈目（Gymnophiona）则无四肢而头骨发达（Feller & Hedges，1998）。建立在现存和化石种类的形态学特征基础上普遍接受的假说认为，现存两栖类是由古生代后期（300～250百万年）一个单系两栖类分化而来，并且认为有尾类和无尾类是姐妹系（Duellman，1988；Milner，1993）。然而，一些化石证据认为现存两栖类是多起源的（Carroll & Holmes，1980；Smithson，1985）。通过几个核基因和线粒体部分基因的研究认为有尾类的蝾螈与蚓螈类的蚓螈为姐妹系（Hedges et al，1990；Hay et al，1995）。为了进一步探讨现存两栖类3个目间的系统发生关系，我们选择了线粒体基因组中tRNA基因来研究这个问题。

在两栖类动物，已经获得了6种动物的线粒体基因组全序列，蚓螈目的泅盲游蚓 *Typhlonectes natans*（Zardoya & Meyer，2000）；有尾目的新疆北鲵 *Ranodon sibiricus*（Zhang et al，2003a）、大鲵 *Andrias davidianus*（Zhang et al，2003b）和卢氏小默螈 *Mertensiella luschani*（Zardoya & Meyer，2001）；无尾目的非洲爪蟾 *Xenopus laevis*（Roe et al，1985）、黑斑蛙 *Rana nigromaculata*（Sumida et al，2001）。

后生动物线粒体tRNA常常以缺失保守或半保守的核苷酸甚至是整个臂为特征（Kumazawa & Nishida，1993），这些结构上的异常可能与简化线粒体翻译的识别机制相联系，从而能使线粒体tRNA积累序列替换，可以用来研究高阶元动物的系统发生关系（Kumazawa & Nishida，1993，1995）。

我们将新测定的泽蛙线粒体基因组与已知的6种两栖类动物进行了详细的比较分析，并以线粒体基因组22个tRNA基因合并数据为基础，重建了两栖类动物的系统发生，探讨现存两栖类3个目间的系统发生关系。

1 材料与方法

1.1 泽蛙线粒体基因组全序列的测定

按照Arnason et al（1991）的方法从泽蛙（标本采自江苏盐城）新鲜的肝脏里提取mtDNA。用纯化后的mtDNA作模板，用两对通用引物分别扩增12*S*（Kocher et al，1989）和16*S* rRNA（Simon et al，1994）基因片段，并测序。在此基础上，设计两对Long-PCR引物扩增两段约7 000 bp长的mtDNA片段，通过限制性内切酶切成大小不等的片段，并克隆到*E. coli* pGEM-3zf$^+$载体中，直接或采用引物步行法测序。克隆片段间的空缺或连接部分通过获得的序列设计引物，以mtDNA为模板扩增的PCR产物直接测序来补齐或证实。

1.2 线粒体DNA序列数据

共有18种代表高等脊椎动物谱系的线粒体全基因用于系统发生分析：两栖类的泽蛙（本研究测定）、泅盲游蚓（GenBank登录号为AF154051，下同）、新疆北鲵（AJ419960）、大鲵（NC004926）、卢氏小默螈（AF154053）、非洲爪蟾（M10217）和黑斑蛙（AB043889）；爬行类的锦龟 *Chrysemys picta*（AF069423）、石龙子 *Eumeces egregius*（AB016606）、鬣蜥 *Iguana iguana*（AJ404872）和密河鳄 *Alligator mississipiensis*（Y13113）；鸟类的日本鹌鹑 *Coturnix japonica*（AP003195）和普通鵟 *Buteo buteo*（AF380305）；哺乳类的针鼹 *Tachyglossus aculeatus*（AJ303116）、大袋鼠 *Macropus robustus*（Y10524）和人 *Homo sapiens*（D38112）；选取硬骨鱼类的鲫鱼 *Carassius auratus*（AB006953）和大马哈鱼 *Oncorhynchus mykiss*（L129771）作为外群。因为分子进化速率相同以及避免长枝的干扰影响（Zardoya & Meyer，2001；Kumazawa et al，1998），选取具有代表性的四足类（Tetrapod）线粒体基因进行分析（因蛇类mtDNA具有较快的进化速率，被去除，Kumazawa et al，1998）。

1.3 系统发生分析

整个线粒体基因组22个tRNA基因的序列合并用来进行系统发生分析。用CLUSTAL X（1.8）进行比对，并且结合人工校对。比对形成的缺失作为丢失的数据来处理，5′和3′端不对称的部分也从分析中去除。使用PAUP*（version 4.0 b10）中的最大简约法（MP）和最大似然法（ML）进行系统发生分析。MP分析采用至少100个随机增加序列重复和以下设置：分类元的10个随机逐步增加的启发式搜索法（heuristic searches），TBR（tree bisection-reconstruction）分支交换（branch swapping），

以及多重树有效选择（MULTREE option in effect）。tRNA 合并数据分析转换/颠换比（Ts:Tv）用 2:1。ML 分析采用 HKY85 模型（Hasegawa et al，1985），使用 Rogers-Swofford 近似值方法获得开始分支长度，通过逐步增加获得开始树，as-is 增加序列，分支交换为TBR，转换/颠换率选择最大可能性，Ts:Tv 为 2:1。系统发生结果用假定的 100 个复制的自引导值分析来检验。

2　结果与分析

泽蛙 mtDNA 全长为 17 717 bp，包括 13 个蛋白编码基因，22 个 tRNA 基因，2 个 rRNA 基因和非编码区（包括控制区），还有一个 $tRNA^{Met}$假基因。泽蛙线粒体全基因组序列已呈送 GenBank，登录号为 AY158705。泽蛙的线粒体基因组基因排列与已知的两栖类有差异，其中除了发现 3 个 tRNA 基因（$tRNA^{Thr}$，$tRNA^{Pro}$和 $tRNA^{Leu(CUN)}$）发生重排外，在脊椎动物中我们首次发现泽蛙有一个独特的 ND5 基因顺序和一个 $tRNA^{Met}$基因拷贝。

从泽蛙和其他 6 种两栖类的线粒体基因组结构比较可以看出，蚓螈目的泅盲游蚓和有尾目的新疆北鲵、大鲵和卢氏小鲵螈，及非洲爪蟾的 22 个 tRNA 基因的排列顺序与大多数脊椎动物一样，没有发生重排现象，而蛙科动物泽蛙和黑斑蛙的 $tRNA^{Thr}$、$tRNA^{Pro}$和 $tRNA^{Leu(CUN)}$基因发生了重排，并且都移位到 $tRNA^{Phe}$基因上游，只不过 $tRNA^{Leu(CUN)}$ 基因位置不同而已。泽蛙的顺序为 $tRNA^{Thr}$/$tRNA^{Pro}$/$tRNA^{Leu(CUN)}$/$tRNA^{Phe}$，而黑斑蛙为 $tRNA^{Leu(CUN)}$/ $tRNA^{Thr}$/$tRNA^{Pro}$/$tRNA^{Phe}$。

使用硬骨鱼鲫鱼和大马哈鱼作为外群（用线粒体数据分析脊椎动物的系统发生，外群的选择参见 Zardoya et al，1998），22 个 tRNA 基因全序列合并数据经比对后共有1 682个位点，其中变异位点为 1 232 个，简约信息位点为 970 个。当用转换/颠换比为 2:1 加权值时（根据泽蛙与其他两栖类的 tRNA 基因比较结果），MP 树支持现生两栖类为单系群，并且有尾目和蚓螈目为姐妹群关系（通过 75%自引导值支持，图 1A），ML（HKY85 模型）分析也以较高的自引导值（86%）支持这个结论（图 1B）。这个结果与蛙类假说（见下述）是相矛盾的，与 Bolt（1991）在形态学基础上提出的有尾类和蚓螈类为姐妹群关系的假说相一致，并得到建立在线粒体和核 rRNA 基因数据基础上的许多分子系统学研究的支持（Hedges et al，1990；Hay et al，1995；Feller & Hedges，1998）。另外，有尾目的新疆北鲵和卢氏小鲵螈先聚在一起（MP 和 ML 分别为 68%和 56%），再与大鲵形成姐妹群关系（图 1），这一结果在一定程度上反映了有尾目中小鲵科、蝾螈科和隐鳃鲵科三者间的关系。

3　讨　论

现存两栖类的 3 个目系统发生关系仍然没有统一意见（Carroll et al，1999）。最广泛被接受的假说是建立在形态学证据基础上，支持现生的两栖类 3 个目在古生代后期（300 百万年）单系起源，并且无尾目和有尾目为姐妹群关系，而排斥蚓螈目（蛙类假说）（Laurin & Reisz，1997）。然而，现生的两栖类是否为单系起源和无尾目与有尾目紧密的系统发生关系一直存在争议。如仅根据头部前面的形态学分析，Jarvik（1980）主张四足动物为多系起源，认为有尾目由孔鳞鱼类（Porolepiform，一种灭绝的突鳍鱼类）演化而来，而无尾目推测为骨鳞鱼类（Osteolepiform，另一种灭绝的突鳍鱼类）的后代。但 Jarvik（1980）并没确定蚓螈目的起源，也没有指明蚓螈目与两栖类另外 2 目间的系统发生关系。Reig（1964）也认为无甲亚纲（Lissamphibia）不是一个自然类群并假设蚓螈目独立起源于现生两栖类的其他类群，蚓螈目与鳞鲵目（Microsauria，一种灭绝的壳椎两栖类）有亲缘关系。另一种假说是 Carroll 和他的同事提出的，认为蚓螈目和有尾目有紧密的系统发生关系，而排斥无尾目（Carroll & Holmes，1980；Carroll，1988）。根据这个假说，无尾类可能从离椎（Temnospondyl）两栖类演化而来（Carroll，1988）。两栖类来自于单系和有尾目与蚓螈目有紧密的系统发生关系，还得到许多形态学（Bolt，1991）和分子（Feller & Hedges，1998）系统发生研究的支持。无尾目与蚓螈目是否为姐妹群关系并没有形态学的资料提及。

Feller & Hedges（1998）运用 12*S* 和 16*S* rRNA 基因全序列研究了两栖类 3 个目（共 9 个科，9 个种）之间的系统发生关系，结果支持有尾目与蚓螈目为姐妹群关系。Zardoya & Meyer（2000）利用非洲爪蟾和泅盲游蚓线粒体全基因组的蛋白编码基因和 tRNA 基因，结合其他脊椎动物的数据，分析结果强力（MP：66% 和 82%；NJ：72% 和 86%；ML：95%和88%）支持无尾目与蚓螈目聚

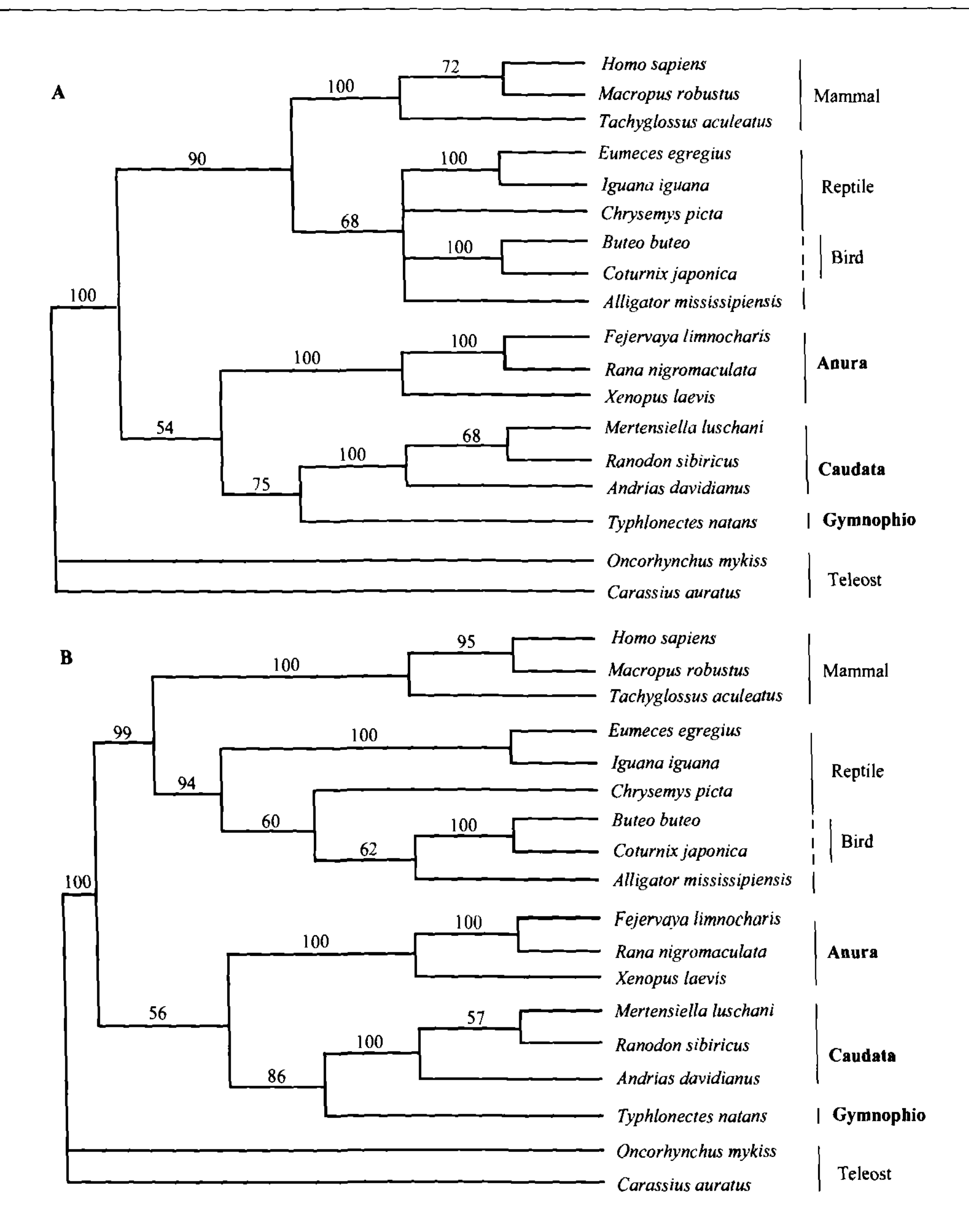


图 1 基于22个tRNA基因全序列合并数据的两栖类系统发生关系树

Fig.1 Phylogenetic position of the amphibian based on a tRNA data set that combines all 22 mitochondrial tRNA genes

A、B分别为MP和ML树，硬骨鱼为外群。MP树为自引导值大于50%的一致树（100假定的复制）；ML树建立在1 000 puzzling steps基础上。结果支持蚓螈类和有尾类为姐妹群关系以及现生两栖类为单系。

The data set was subjected to MP (A) and ML (B) analyses. Teleosts were used as outgroup taxa. MP topologies represent 50% majority rule bootstrap consensus trees based on 100 pseudoreplications. Support shown for the ML tree is based on 1 000 puzzling steps. This data set strongly favors a caecilian + urodeles, *i.e.*, monophyly of living amphibians.

成一支（但没有有尾目参与分析），两栖类为单系群，同时用两个rRNA基因的合并数据分析两栖类的系统关系，MP树结果支持现存两栖类为单系(70%)，无尾目与有尾目为姐妹群关系，但是自引导值中等支持（54%）。Zardoya & Meyer（2001）在测定卢氏小鲵螈和泗盲游蚓的线粒体全基因的基础上，结合其他脊椎动物（羊膜动物），以肺鱼和腔棘鱼作外群，结果表明蛋白编码基因、tRNA和rRNA基因的分别合并数据一致支持无尾目和有尾目为姐妹群，而排斥蚓螈目，两栖类为单系群。但是以上结果存在一定的片面性：首先，无尾目只有非洲爪蟾唯一代表，而非洲爪蟾的全序列被怀疑存

在错误（Feller & Hedges，1998），没有蛙科动物；其次，选择的外群不统一（Feller & Hedges，1998，为羊膜动物；Zardoya & Meyer，2000，为9种硬骨鱼；Zardoya & Meyer，2001，仅肺鱼和腔棘鱼）；第三，参与分析的羊膜动物数量不同（Feller & Hedges，1998，每个谱系单个代表；Zardoya & Meyer，2000，每个谱系有多个代表）；第四，碱基的转换/颠换比的加权值也不一致（Zardoya & Meyer，2001，为1∶1；Zardoya & Meyer，2000，tRNA和rRNA分别为3∶1和2∶1），通过我们对泽蛙与其他两栖类的比较发现 tRNA 和 rRNA 的转换/颠换比大约分别为2∶1和1∶1。

线粒体基因组的基因排列顺序可以提供评估脊椎动物系统发生关系的重要信息（Macey et al，1997），脊椎动物线粒体基因重排相对较少发生，但是当重排出现时，将能够鉴别单系群，因为大量可能的基因排列使得同样的基因顺序分别独立地产生是相当不可能的，因此具有共同的基因排列顺序很可能表明有共同的祖先（Boore & Brown，1994）。我们根据线粒体22个 tRNA 基因全序列合并数据研究现生两栖类的系统发生关系，结果表明有尾目和蚓螈目为姐妹群关系，而排斥无尾目。已知的蚓螈目的泗盲游蚓和有尾目的新疆北鲵、大鲵及卢氏小默螈的线粒体基因组结构都没有发现基因重排，表明有尾目与蚓螈目间有较近的亲缘关系；而蛙类泽蛙、黑斑蛙线粒体 tRNA 基因有重排现象，并且涉及重排的 tRNA 基因都为 $tRNA^{Thr}$、$tRNA^{Pro}$和 $tRNA^{Leu(CUN)}$。此外，现存无尾目内物种间的分化程度较大，提示现存无尾目在两栖类进化历史中有过较繁盛的时期，在地球上分布较广，由于适应不同的生态环境，加速了这一类群的遗传分化（重排），这也是现存两栖类中以无尾目种类居多，分布较广的原因，只是非洲爪蟾是一个例外(没有基因重排)。

虽然利用整个线粒体 tRNA 基因合并数据分析现存两栖类的系统关系，支持蚓螈目和有尾目为姐妹群关系，但是它们与无尾目形成单系群的自引导值相对要低，MP 和 ML 树仅为54%和56%。另外，新疆北鲵、大鲵和卢氏小默螈分别代表了有尾目的小鲵科、隐鳃鲵科和蝾螈科，从图1中可以看出，小鲵科与蝾螈科有更近的系统关系，但是在 ML 树中自引导值中等支持。由于仅有7个代表物种的全序列，并且蚓螈类也只有一种，因此，还需要进一步增加两栖类各个目间的物种数，以便进一步探讨各科间的系统发生关系。

我们并没有选取蛋白编码基因和 rRNA 基因合并数据来分析两栖类的系统发生关系，因为从泽蛙与其他两栖类13种蛋白编码基因的比较发现，不同的蛋白编码基因进化速率有很大的不同，如 COⅠ、COⅢ基因相对保守，而 ATP8 及 ND4 等变异较大，同时变异较大的基因颠换大于转换（Sumida et al，2001）。另外核苷酸的三位密码子的变异速率也不同，特别是很多第三位密码子摆动并不影响氨基酸的变化。而在运用系统发生软件分析时往往用同一个转换/颠换速率，以及同样的加权值，因此很可能得出不正确的结果。线粒体 rRNA 序列数据在12*S* 和16*S* rRNA 的不同区域位点之间表现出不同的变异速率（Zardoya & Meyer，2000），将两个不同的 rRNA 数据合并分析同样也可能会出现偏差。

而线粒体 tRNA 基因由于有大致相同的核苷酸数，以及三叶草型的二级结构，相对于核 tRNA 基因，线粒体 tRNA 基因具有较高的进化速率（Saccone et al，1999），碱基的转换/颠换速率也大致相当，因此合并后并不影响分析结果。线粒体 DNA 序列经常用来推测具有紧密亲缘关系动物的系统发生，但是其中蛋白编码基因很少用在那些分歧时间超过300百万年的动物上，这或许是由于蛋白编码基因比 tRNA 基因的茎部更易受自然选择的影响，对于研究高阶元动物的系统发生，线粒体 tRNA 基因序列是非常有用的工具（Kumazawa & Nishida，1993）。一些线粒体 tRNA 基因结构在爬行类、两栖类和鱼类中有变化，而这些谱系的分化时间都远远超过100百万年，通过研究 tRNA 基因结构的共源性及运用 tRNA 基因序列构建分子系统树，可以研究这些高阶元动物的系统发生关系（Kumazawa & Nishida，1995）。

许多研究指出，当只有短的序列数据来分析亲缘关系较远的类群的系统发生关系时，容易产生错误的结论（Russo et al，1996；Zardoya & Meyer，1996）。较长的或相对异质性的（Heterogenous）数据，如线粒体全序列，具有许多系统发生信息位点，能够较可靠地解决系统发生中的许多问题（Russo et al，1996；Zardoya & Meyer，1996）。虽然利用线粒体全基因序列分析比单个基因可以提供更可靠的进化关系评估，但即使线粒体全基因序列也不能确保发现那些有快速起源的古代谱系间的正

确的拓扑关系，利用线粒体全序列分析系统关系存在缺陷的详细讨论，诸如位点间的变异速率，不同谱系间进化速率差异，碱基偏斜和饱和等的影响，参见如 Zardoya et al (1998)。

参考文献：

Arnason U, Gullberg A, Widegren B. 1991. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the fin whale, *Balaenoptera physalus* [J]. *J. Mol. Evol.*, **33**: 556-568.

Bolt JR. 1991. Lissamphibian origins [A]. In: Schultze HP, Trueb L. Origins of the Major Groups of Tetrapods: Controversies and Consensus [M]. Ithaca, NY: Cornell University Press. 194-222.

Boore JL, Brown WM. 1994. Complete DNA sequence of the mitochondrial sequence of the black chiton, *Katharina tunicata* [J]. *Genetics*, **138**: 423-443.

Carroll RL. 1988. Vertebrate Paleontology and Evolution [M]. New York: Freeman.

Carroll RL, Holmes R. 1980. The skull and jaw musculature as guides to the ancestry of salamanders [J]. *Zool. J. Linnean Soc.*, **68**: 1-40.

Carroll RL, Kuntz A, Albright K. 1999. Vertebral development and amphibian evolution [J]. *Evol. Dev.*, **1**: 36-48.

Duellman WE. 1988. Evolutionary relationships of the Amphibia [A]. In: Fritzsch B. The Evolution of the Amphibian Auditory System [M]. New York: Wiley. 13-14.

Feller AE, Hedges SB. 1998. Molecular evidence for the early history of living amphibians [J]. *Mol. Phylogent. Evol.*, **9**: 509-516.

Hasegawa M, Kishino H, Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA [J]. *J. Mol. Evol.*, **22**: 160-174.

Hay JM, Ruvinsky I, Hedges SB, Maxson LR. 1995. Phylogenetic relationships of amphibian families inferred from DNA sequences of mitochondrial 12*S* and 16*S* ribosomal RNA genes [J]. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 928-937.

Hedges SB, Moberg KD, Maxson LR. 1990. Tetrapod phylogeny inferred from 18*S* and 28*S* ribosomal RNA sequences and a review of the evidence for amniote phylogeny [J]. *Mol. Biol. Evol.*, **7**: 607-633.

Jarvik E. 1980. Basic Structure and Evolution of Vertebrates [M]. London: Academic Press.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: Amplification and sequence with conserved primers [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 6169-6200.

Kumazawa Y, Nishida M. 1993. Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes and deep-branch animal phylogenetics [J]. *J. Mol. Evol.*, **37**: 380-398.

Kumazawa Y, Nishida M. 1995. Variations in mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers [J]. *Mol. Biol. Evol.*, **12**: 759-772.

Kumazawa Y, Ota H, Nishida M, Ozawa T. 1998. The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control region [J]. *Genetics*, **150**: 313-329.

Laurin M, Reisz R. 1997. A new perspective on tetrapod phylogeny, In: Suemida SS, Martin KL. Amniote Origins [M]. New York: Academic Press. 9-59.

Macey JR, Larson A, Ananjeva NB, Fang Z, Papenfuss TG. 1997. Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome [J]. *Mol. Bio. Evol.*, **14**: 30-39.

Milner AR. 1993. The Paleozoic relatives of lissamphibians [J]. *Herpetol. Mongr.*, **7**: 8-27.

Reig O. 1964. El problema del origen monofilético o polifilético de los anfibios, con consideraciones sobre las relaciones entre Anuros, Urodelos y Apodos [J]. *Ameghiniana*, **3**: 191-211.

Roe BA, Din-Pow M, Wilson RK, Wong JF. 1985. The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome [J]. *J. Biol. Chem.*, **260**: 9759-9774.

Russo CAM, Takezaki N, Nei M. 1996. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny [J]. *Mol. Biol. Evol.*, **13**: 525-536.

Saccone S, Giorgi CD, Gissi C, Pesole G, Reyes A. 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system [J]. *Gene*, **238**: 195-209.

Simon C, Frait F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, **87** (6): 651-701.

Smithson TR. 1985. The morphology and relationships of the Carboniferous amphibian *Eoherpeton watsoni* Panchen [J]. *Zool. J. Linnean Soc.*, **85**: 317-410.

Sumida M, Kanamori Y, Kaneda H, Kato Y. 2001. Complete nucleotide sequence and rearrangement of the mitochondrial genome of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata* [J]. *Genes Genet. Syst.*, **76**: 311-325.

Zardoya R, Meyer A. 1996. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the lungfish (*Protopterus dolloi*) supports its phylogenetic position as a close relative of land vertebrates [J]. *Genetics*, **142** (4): 1249-1263.

Zardoya R, Meyer A. 2000. Mitochondrial evidence on the phylogenetic position of caecilians (Amphibia: Gymnophiona) [J]. *Genetics*, **155**: 765-775.

Zardoya R, Meyer A. 2001. On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 7380-7383.

Zardoya R, Cao Y, Hasegawa M, Meyer A. 1998. Searching for the closest living relative (s) of tetrapods through evolutionary analyses of mitochondrial and nuclear data [J]. *Mol. Biol. Evol.*, **15**: 506-517.

Zhang P, Chen YQ, Zhou H, Wang XL, Qu LH. 2003a. The complete mitochondrial genome of a relic salamander, *Ranodon sibiricus* (Amphibia: Caudata) and implications for amphibian phylogeny [J]. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **28**: 620-626.

Zhang P, Chen YQ, Liu YF, Zhou H, Qu LH. 2003b. The complete mitochondrial genome of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* (Amphibia: Caudata) [J]. *Gene*, **311**: 93-98.